

Tesis doctoral

Integración de técnicas basadas en ADN para el desarrollo de biosensores aplicados en seguridad alimentaria

Resumen en castellano

La seguridad alimentaria está garantizada cuando se dispone de alimentos suficientes, nutritivos e inócuos. Esta garantía, además, ha de cumplirse a lo largo de todo el proceso productivo, lo que se conoce como “seguridad de la granja a la mesa”. Nace así una nueva forma de abordar el problema, con un enfoque global y un tratamiento integral.

Para afrontar este reto, las técnicas moleculares basadas en el empleo de ácidos nucleicos son, actualmente, utilizadas en la detección de amenazas alimentarias, como por ejemplo, alérgenos, microorganismos, organismos genéticamente modificados (OGM), o la autenticación de especies.

Sin embargo, muchos de los métodos en uso presentan limitaciones, ya que son costosos, complicados, y requieren personal y equipamiento especializado. La tecnología de biosensores es una aproximación adecuada, ya que proporciona resultados fiables de manera sencilla y rápida, y con capacidades añadidas como portabilidad y automatización para llevar a cabo los ensayos directamente en puntos de control (POC).

Esta tesis se ha centrado en el desarrollo de un sistema biosensor, basado en la tecnología de disco compacto, para la detección de ácidos nucleicos en aplicaciones de seguridad alimentaria adaptable a POC. Las investigaciones llevadas a cabo han permitido obtener nuevos conocimientos en tecnologías génicas, pudiendo efectuar aportaciones metodológicas de interés caracterizadas por su miniaturización, integración y automatización.

En este sentido, una parte de la investigación aborda la simplificación de la etapa de amplificación del ADN diana, eludiendo el termociclado mediante el empleo de técnicas alternativas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se han estudiado dos técnicas de amplificación isoterma, la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) y la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). La detección se lleva a cabo mediante ensayos de

hibridación con sondas de ADN inmovilizadas en formato micromatriz sobre la superficie de policarbonato de un DVD. Además, la amplificación por RPA se ha combinado con la detección mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación simultánea de múltiples analitos.

En otra aproximación, se han integrado las fases de amplificación e hibridación en una única etapa, simplificando aún más el proceso analítico. Para ello, la amplificación isoterma por RPA se realiza en fase sólida sobre la superficie del disco en diferentes formatos: gota, cámaras microfluídicas o microreactores. En los dos primeros formatos, las reacciones tienen lugar en la superficie del DVD y la medición se realiza registrando la intensidad del haz láser del lector reflejado, mientras que en el tercer caso la reacción se lleva a cabo en micropocillos integrados en la estructura del DVD y la lectura se realiza midiendo la intensidad de la señal transmitida.

Finalmente, se ha desarrollado una metodología para monitorizar la síntesis de ADN en tiempo real, integrando así las etapas de amplificación y cuantificación. Para ello, se emplea la reacción de amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP), registrando secuencialmente el avance de la reacción mediante cambios turbidimétricos o colorimétricos en el medio de reacción. De este modo, se relaciona el perfil de cada ensayo con el número de copias de cada gen diana, permitiendo así su cuantificación.

Para cada metodología se han establecido las propiedades analíticas, y los resultados obtenidos han sido validados por comparación con técnicas de referencia y mediante el empleo de muestras certificadas. Como prueba de concepto, los diferentes desarrollos se han aplicado a la detección y determinación de la presencia de alérgenos (avellana, cacahuete, soja, tomate y maíz), organismos modificados genéticamente (p35S, tNOS y Bt-11), bacterias patógenas (*Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. y *Campylobacter* spp.) y hongos (*Fusarium* spp.), así como la identificación de especies cárnicas.